

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 6 C12N 9/64	A1	(11) 国際公開番号 WO 95/15374 (43) 国際公開日 1995年6月8日 (08.06.95)
(21) 国際出願番号 PCT/JP94/02009 (22) 国際出願日 1994年11月30日 (30. 11. 94) (30) 優先権データ 特願平5/341061 1993年11月30日 (30. 11. 93) JP (71) 出願人 (本国を除くすべての指定国について) 富士薬品工業株式会社 FUJII YAKUHIN KOGYO KABUSHIKI KAISHA (JP/JP) 〒933 富山県高岡市長慶寺530番地 Toyama, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (本国についてのみ) 清水元治 (SEIKI, Motoharu) (JP/JP) 〒920 石川県金沢市涌波3丁目10番14号 Ishikawa, (JP) 佐藤 博 (SATO, Hiroshi) (JP/JP) 〒921 石川県金沢市平和町3丁目18番15号 平和宿舍C57-11 Ishikawa, (JP) 品川 朗 (SHINAGAWA, Akira) (JP/JP) 〒933 富山県高岡市長慶寺530番地 富士薬品工業株式会社内 Toyama, (JP) (74) 代理人 弁理士 南 孝夫 (MINAMI, Takao) 〒102 東京都千代田区麹町3丁目2番地 相互第一ビル Tokyo, (JP) (81) 指定国 US, 欧州特許 (DE, FR, GB, IT).	添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title : NOVEL METALLOPROTEASE AND DNA CODING FOR THE SAME (54) 発明の名称 新規なメタロプロテアーゼおよびそれをコードするDNA (57) Abstract A novel metalloprotease, a DNA coding for the same, a plasmid having the sequence of the DNA, a host cell having the plasmid, and a monoclonal antibody binding specifically to the protein thereof, being useful in the medical and physiological fields for recognizing the presence of a cancer cell, diagnosing cancer malignancy, and other applications.		

BEST AVAILABLE COPY

(57) 要約

新規なメタロプロテアーゼ、それをコードするDNA、そのDNA配列を有するプラスミドおよびそのプラスミドを有する宿主細胞ならびにそのタンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体。

癌細胞の存在の有無、癌の悪性度の診断等の医学的、生理学的分野の用途に有用である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AT	オーストリア	ES	スペイン	LR	リベリア	SD	スーダン
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BF	ブルキナ・ファソ	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BG	ブルガリア	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャード
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MR	モリタニア	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MW	マラウイ	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	JP	日本	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	KE	ケニア	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KG	キルギスタン	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	US	米国
CN	中国	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド	VN	ヴェトナム
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク			RO	ルーマニア		

明 細 書

発 明 の 名 称

新規なメタロプロテアーゼおよび
それをコードするDNA

5 技術分野

本発明は、癌細胞の存在の有無、癌の悪性度の診断等に、あるいはその他の医学的、生理学的分野の用途に有用な新規なメタロプロテアーゼに関する。

さらに詳しく言えば、本発明はヒト癌細胞で特異的に
10 発現しているメタロプロテアーゼの1種ならびにそれを
コードする遺伝子DNA配列、そのDNA配列を含有する塩基
配列を有するプラスミド、そのプラスミドを有する宿主
細胞、該宿主細胞を用いる該タンパク質の製造方法、前
記DNA配列とハイブリダイズするプローブ、該プローブ
15 を用いる前記DNA配列を有するDNAまたはRNAの検出方法、
前記のタンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗
体に関するものである。

背景技術

コラーゲン、プロテオグリカン、エラスチン、フィブ
20 ロネクチン、ラミニン等の複雑な成分から構成される細
胞外マトリックスの分解には、基質特異性を異にするマ
トリックスメタロプロテアーゼと総称される一群の酵素
(以下MMPsと略記する)が関与している。

これまでMMPsとしては、間質型コラゲナーゼ(MMP-1)、
25 72kDaゼラチナーゼ(IV型コラゲナーゼあるいはゼラチナ

ーゼ A ともいう : MMP-2)、92kDaゼラチナーゼ (IV型コラ
ゲナーゼあるいはゼラチナーゼ B ともいう : MMP-9)、ス
トロムライシン-1 (MMP-3)、マトリライシン (MMP-7)、
好中球コラゲナーゼ (MMP-8)、ストロムライシン-2
5 (MMP-10)、ストロムライシン-3 (MMP-11)等が報告され
ている。

これらの MMPs はファミリーを形成し、遺伝子の一次構
造は既に報告されている。決定されている MMPs ファミリー
一間の一次構造においては、MMP-7を除き各 MMP は基本的
10 に N-末端プロペプチドドメイン、Zn²⁺結合触媒ドメイ
ン、C-末端ヘモペキシン凝血酵素様ドメインの3つから
構成されている。MMP-7においてはヘモペキシン凝血
酵素様ドメインはない。MMP-2とMMP-9では、この他にゼ
ラチン結合ドメインを含んでいる。さらに、MMP-9では、
15 Zn²⁺結合触媒ドメインとC-末端ヘモペキシン凝血酵素
様ドメインの間にプロリンに富むV型コラーゲン α 2鎖
と相同性の高いドメインが挿入されている。

転移性の高い癌細胞では、IV型コラーゲンを主たる基
質とするIV型コラゲナーゼ (MMP-2、MMP-9)の顕著な発現
20 が見られることが報告されており (キャンサー リサーチ
(Cancer Res.)、第46巻、1~7頁 (1986); バイオケミ
カル アンド バイオフィジカル リサーチ コミュニケー
ションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.)、第154巻、
832~838頁 (1988); キャンサー (Cancer)、第71巻、1368
25 ~1383頁 (1993))、また、MMP-9の活性化がMMP-3の作用

によって引き起こされることが報告されている(ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー(J. Biol. Chem.)第267巻、3581~3584頁(1992))。

- 5 マトリックスメタロプロテアーゼの発現の程度は、癌の悪性度を診断する指標となる。

発明の開示

本発明者らは新規なマトリックスメタロプロテアーゼ(以下本明細書においてはMT-MMPと記述する)を見出し、その構造分析を行った。

- 10 本発明により、下記に記載されるとおり、新規なメタロプロテアーゼタンパク質、そのタンパク質をコードする塩基配列を有するDNA、このDNA塩基配列を有するプラスミド、このプラスミドを有する宿主細胞ならびに上記メタロプロテアーゼタンパク質を特異的に認識するモノ
15 クローナル抗体が提供される。

1. 配列表配列番号1に示されているアミノ酸配列を有するタンパク質。

2. 配列表配列番号1に示されているアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする配列表配列番号2に示さ
20 れている塩基配列を有するDNA。

3. 配列表配列番号2に示されている塩基配列を有するDNA配列を含有し、配列表配列番号1に示されているタンパク質を発現するプラスミド。

4. 配列表配列番号2に示されている塩基配列を有す
25 るDNA配列を含有し、配列表配列番号1に示されている

タンパク質を発現するプラスミドを有する宿主細胞。

5. 配列表配列番号 1 に示されているアミノ酸配列を有するタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体。

5 以下に、本発明を詳細に説明する。

本発明者らは、公知のマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)ファミリーのアミノ酸配列から選択した高度に保存されている配列(配列表配列番号 3 および 4)より、配列表配列番号 5 および 6 に記載した配列を有するオリ
10 ゴヌクレオチドプライマーを設計、合成した。該オリゴヌクレオチドプライマーとヒト胎盤 cDNA ライブラリーを用い、PCR 反応を行い、得られた PCR 産物の各 DNA の塩基配列を決定し、公知の MMP と相同でない配列を有する 390
15 b. p. の DNA 断片を得た。この 390 b. p. DNA 断片をプローブとし、ヒト胎盤 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、得られた陽性クローンのファージ DNA 中に組み込まれていた cDNA の塩基配列を決定した。塩基配列は配列表配列番号 2 に記載の塩基配列である。配列表配列番号 2 に記載の塩基配列と同一の配列は、GENBANK/EMBL DNA
20 Data Base 中には存在せず、この塩基配列を有する DNA は全く新規なものであることが認められた。

配列表配列番号 2 に記載した上記のクローンの cDNA の塩基配列は、3' 非翻訳配列と共に推定 582 アミノ酸残基のオープンリーディングフレームを有していた。開始コ
25 ドンは塩基番号 112 に位置し、停止コドンは塩基番号

1858に存在する。このオープンリーディングフレームは、配列表配列番号1に記載した582アミノ酸からなる配列をコードしており、開始コドンのすぐ下流から推定されるシグナル配列が続き、C末端のアミノ酸番号533から
5 562に20個以上の疎水性アミノ酸の連続した膜結合型タンパク質に特徴的な疎水性領域(配列表配列番号7)が存在することが認められた。

図2に示すようにMT-MMPのアミノ酸配列と公知のMMPファミリーのアミノ酸配列との相同性を調査した結果、
10 MT-MMPは公知のMMPファミリーと高い相同性を示した。MMPファミリーで保存されている前駆体と成熟体のプロセッシング部位近傍の配列、および活性部位の配列はMT-MMP中で最も良好に保存されていた。またMT-MMPでは、
15 他のMMPファミリーのアミノ酸配列上には認められない配列表配列番号7に示した疎水性アミノ酸の連続した配列が存在し、膜貫通型タンパク質の構造的特徴を有することから、他のMMPファミリーとは異なる膜結合型のMMPであることが強く示唆された。

MT-MMPのヒト組織中での発現を各種の組織由来Poly(A)
20 RNAに対するノーザンブロット分析により検討した結果、胎盤、肺、腎臓で高い発現をしていることが認められた(図3参照)。また、ヒト肺扁平上皮癌の正常部分および癌部分から抽出したRNAに対しノーザンブロット分析を行った結果、MT-MMPは癌部位で特異的に発現していること
25 が認められた(図4参照)。

なお、本発明のMT-MMPは、抗MT-MMPモノクローナル抗体を用いた免疫沈降や免疫染色実験により遺伝子産物が分泌されることなく細胞膜上に発現されていることが示され、また、MT-MMP遺伝子をトランスフェクションした細胞では、MT-MMPの発現に依存したMMP-2の活性化が観察された(ネイチャー(Nature)、第370巻、61～65頁(1994))。

以上述べた本発明者らの研究成果により、本発明により、配列表配列番号1に記載されたアミノ酸配列を有する新規なマトリックスメタロプロテアーゼタンパク質が提供される。

また、本発明により配列表配列番号1に記載されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードしている配列表配列番号2に記載された塩基配列を有するDNA、該DNAを有し発現し得るプラスミド、このプラスミドを有する宿主細胞が提供される。上記の宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌などの原核細胞宿主、酵母、COS細胞、CHO細胞、3T3細胞などの真核細胞、Sf21などの昆虫細胞等、通常遺伝子組換え技術で用いられる全ての宿主細胞を用いることができる。上記のプラスミドとしては、通常用いられる宿主細胞に応じた発現ベクターを用いることができる。

さらに本発明により、配列表配列番号2に記載された塩基配列を有するDNAから転写されるmRNAが提供される。

上記のDNAあるいはRNAとハイブリダイズし、該DNAまたはRNAを特異的に検出するプローブも提供されるが、該プローブは、通常使用される放射性同位元素、酵素などにより標識され、通常のプロットィング分析、
5 insituハイブリダイゼーションで該DNAあるいはRNAと特異的にハイブリダイズし、検出できるものであれば配列表配列番号2に記載した塩基配列の一部を有するものであればよく、どのような塩基配列でもよい。

さらに、本発明は、本発明に係るMT-MMPと特異的に結合するモノクローナル抗体を提供する。
10

本発明に係るモノクローナル抗体は、ヒトMT-MMPを免疫原として公知の方法、例えばミルシュタインらの方法（ネイチャー（Nature）、第256巻、495～497頁（1975））により製造することができる。この方法において、免疫原
15 としては天然型ヒトMT-MMP、組換えヒトMT-MMPおよびそれらの一部のアミノ酸配列を有する合成ペプチド等の何れでもよい。

本発明により、本発明に係る新規なMT-MMPのアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする塩基配列を有する
20 DNAをクローン化し、そのDNAおよびそのDNAにコードされているタンパク質を遺伝子工学的方法により製造することができる。この新規なMT-MMPのcDNAクローンを用いることにより、上記の塩基配列を遺伝子工学的に常用される方法を用いて他のベクターあるいは宿主へのクロー
25 ン化を行うことができる。また、上記のcDNAの塩基配列

に準拠して適宜、プローブに適したDNAを設計し、調製
することができる。さらに、本発明に係わるMT-MMPの遺
伝子塩基配列をもとに遺伝子工学的に常用される方法を
用いることにより、MT-MMPのアミノ酸配列中に適宜、1
5 個ないしは複数個以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、
転移あるいは付加した如き変異を導入した相当するタン
パク質を製造することができる。メタロプロテアーゼの
共通の特徴である前駆体と成熟体のプロセッシング部位
近傍の配列や活性部位の配列、ドメイン構造、MT-MMPの
10 特徴であるC末端近傍に存在する疎水性アミノ酸の連続
した疎水性領域が維持されていれば、上記の如き誘導体
は全て本発明に包含される。

本発明の前述した種々の態様を利用することにより、
癌細胞の存在の有無、癌の悪性度などの診断用の診断剤
15 あるいは診断方法の用途に、あるいはまた、その他の医
学的生理学的分野の用途に適用される種々の技術手段を
提供することができる。

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本
発明は、これら実施例により限定されるものではない。

20 実施例

実施例 1

新規なメタロプロテアーゼ(MT-MMP)cDNAの単離

(a) cDNAライブラリーの構築

ヒト胎盤組織から全RNAをグアニジン-塩化セシウム
25 法(バイオケミストリー(Biochemistry)、第18巻、5294

～5299頁(1979))により抽出し、ポリ(A)⁺RNAをオリゴ(dT)-セルロースカラムを使用して精製した。精製したポリ(A)⁺RNAをテンプレート、オリゴ(dT)をプライマーとしてガブラー・ホフマン(Gubler・Hoffman)法(ジーン(Gene)、第25巻、263～269頁(1983))に従い、cDNAを合成した。T₄DNAポリメラーゼによりcDNAの末端を平滑化した後、EcoR IメチラーゼによりcDNA中に存在するEcoR Iサイトをメチル化した。さらにEcoR Iリンカー[d(pG-G-A-A-T-T-C-C)]とcDNAをT₄DNAリガーゼを用い連結させた後、EcoR I消化することにより両末端にEcoR Iサイトを有するcDNAを構築した。このcDNAをλgt11のEcoR IサイトにT₄DNAリガーゼを用い連結させた。次にこのcDNAを例えばインビトロパッケージングキット(Amersham)を使用し、インビトロパッケージングを行い、cDNAライブラリーを構築した。cDNAライブラリーとして市販の例えばヒト胎盤cDNAライブラリー(CLONTECH)を使用することもできる。

(b) 合成オリゴヌクレオチドプライマーの作製

既知のMMPsファミリーのアミノ酸配列の中から、MMPsファミリー中で高度に保存されているアミノ酸配列として配列表配列番号3(P-1)および配列番号4に記載した配列(P-2)を選択した。このオリゴペプチドP-1およびオリゴペプチドP-2のそれぞれに対応するオリゴデオキシヌクレオチドプライマーを設計した。すなわち、オリゴペプチド中に2つ以上のコドンでコードされるアミノ酸

- が存在する場合その混合物とし配列表配列番号5（プライマー1）および配列番号6（プライマー2）に記載した配列のごとく設計した。このプライマー1およびプライマー2をDNAシンセサイザModel 392（Applied Biosystems）を使用し、 β -シアノエチルフォスフォアミダイト（ β -cyanoethyl phosphoramidite）法により合成した。得られたプライマー1およびプライマー2は10mMリン酸ナトリウム緩衝液pH6.8で平衡化したニックカラム（Pharmacia）を用い精製した。
- 10 （c） PCRによる遺伝子増幅
- ヒト胎盤由来のcDNAをテンプレート、前項（b）に記載したプライマー1およびプライマー2をプライマーとしてPCR反応（PCRテクノロジー（PCR Technology）63～67頁、ストックトンプレス（Stockton Press））を行った。
- 15 その結果、390b. p. のPCR産物を得た。得られたPCR産物を適当なプラスミド、例えばpUC 119やpBluescriptにクローニングし、このPCR産物の塩基配列を、蛍光DNAシーケンサModel 373A（Applied Biosystems）、Taqダイブライマーサイクルシーケンシングキット（Applied Biosystems）を使用し決定した。塩基配列を決定した種々のPCR産物の中から既知MMPの塩基配列と相同性のないPCR産物Aを得た。このPCR産物Aを前述の（a）項に記載したヒト胎盤組織cDNAライブラリーをスクリーニングするためのプローブとして用いた。プローブの ^{32}P 標識は、
- 20 ランダムプライムドDNAラベリングキット（Boehringer
- 25

Mannhaim)を使用して行った。

(d) cDNAライブラリーからの新規MMP遺伝子のスクリーニングと塩基配列の決定

前述の(a)に記載した λ gt11中に構築したヒト胎盤
5 cDNAライブラリーを宿主菌大腸菌Y1090に感染させ、ブ
ラークを形成させた。すなわち、Y1090株を0.02%マル
トースを含むL培地で1晩培養後、集菌し、10mM MgSO_4
に懸濁した。この細胞懸濁液とファージ液を混合し37℃
15分間インキュベートし、ファージを宿主菌に吸着させ
10 た。これに軟寒天を加え、Lプレート上に広げた(上記
の操作を以後プレーティングと称す)。プレートを42℃
で1晩インキュベートし、ブラークを形成させた後、ナ
イロンフィルター(例えば、ハイボンドーN(Amersham))
あるいはニトロセルロースフィルター(例えばHATF
15 (Millipore))をプレート上に置き、約30秒間放置した。
膜を穏やかに剥がしアルカリ変性液(0.1M NaOH、1.5M
NaCl)に30秒間浸した後、中和液(1.5M NaCl含有0.5M
Tris-HCl緩衝液、pH8)に5分間浸した。このフィルタ
ーを2×SSPE(0.36M NaCl、20mM NaH_2PO_4 、2mM EDTA)
20 で洗浄した後、風乾した。上述のブラークのフィルター
への転写を繰り返し、少なくとも2枚のフィルターを調
製した。但し、2枚目以降のフィルターとプレートの接
触時間は2分間程度に延長した。このフィルターを80℃
で2時間ベーキングし、DNAを固定した。1つのプレ
25 ートから調製した少なくとも2枚のフィルターをそれぞれ

42℃、1時間洗浄液(1 M NaCl、1 mM EDTAおよび0.1% SDS含有50mM Tris-HCl緩衝液、pH8.0)で洗浄後、ハイブリダイゼーションバッグ中にフィルターを入れ、プレハイブリダイゼーション溶液(50% formamide、5 × Denhardt's 溶液(0.2% ウシ血清アルブミン、0.2% polyvinylpyrrolidone)、5 × SSPE、0.1% SDS、100 μg/ml 熱変性サケ精子DNA)に浸し、42℃で6~8時間プレハイブリダイゼーションを行った。次に100℃、5分間加熱変性させた(c)項で記載した³²P標識プローブをプレハイブリダイゼーション溶液に添加し、42℃で1晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション完了後、フィルターを室温で多量の0.1% SDS含有2 × SSC溶液で洗浄した。次にフィルターを0.1% SDS含有1 × SSC溶液中に68℃、15分間置いた。このフィルターを風乾した後、X線フィルム(Kodak XR)と重ね-70℃で1週間オートラジオグラフィーを行った。X線フィルムを現像し、1枚のプレートからできた2枚のフィルムを重ね、重なるシグナルをマークした。マークしたシグナルに相当するブランクをSM溶液(100mM NaClおよび10mM MgSO₄含有50mM Tris-HCl緩衝液、pH7.5)に懸濁した。このファージ懸濁液を適度に希釈してプレーティングし、上記と同様のスクリーニングを行い、組換え体ファージを得た。

(e) 組換え体λgt11 DNAの調製

クローン化したファージをそれぞれプレーティングし

42℃、3時間インキュベートし、続いて37℃、1晩イン
キュベートした後SM溶液に数滴のクロロホルムを加え室
温で30分間放置した。SM溶液と共に上層の軟寒天を掻き
取り、遠心分離した。遠心後の上清に終濃度10%になる
5 ようにポリエチレングリコールを加え攪拌した後、4℃
で1時間放置した。これを遠心分離し上清を捨て、ファ
ージ粒子を回収した。このファージ粒子をSM溶液に懸濁
し、グリセロールグラジエント超遠心分離法（モレキュ
ラークローニング、ア ラボラトリー マニュアル
10 (Molecular cloning, a laboratory manual)、T. マニ
アスチス(T. Maniatis)他著、コールド スプリング ハ
ーバー ラボラトリー プレス(Cold Spring Harbor
Laboratory Press)発行、2.78頁(1989))により精製した。
得られたファージをTM溶液に懸濁し、DNase Iおよび
15 RNase Aで処理後、20mM EDTA、50 μ g/ μ l Proteinase K
および0.5% SDSの混合液を加え65℃、1時間インキュベ
ートした。これをフェノール抽出、ジエチルエーテル抽
出後、エタノール沈殿によりDNAを沈殿させた。得られ
たDNAを70%エタノールで洗浄後乾燥し、TE溶液(10mM
20 EDTA含有10mM Tris-HCl緩衝液、pH8)に溶解した。

(f) 挿入断片の塩基配列決定

前項(e)で調製した λ gt11 DNAをEcoR Iで分解し、
挿入断片を分離精製後、ベクター p Bluescript
(Stratagene)のEcoR I部位にクローニングした。この
25 組換え体 p Bluescriptで大腸菌NM522 XLI-Blueを形質

転換した。形質転換細胞をF' 選択後、ヘルパーファージVCSM13(Stratagene)を感染させ終液培養した。培養液を遠心分離し菌体を除き、これにPEG/NaClを加えファージを沈殿させた。沈殿をTE溶液に懸濁後、1本鎖DNAをフェノール抽出、エタノール沈殿により回収した。この1本鎖DNAの塩基配列を蛍光DNAシーケンサModel 373A (Applied Biosystems)、Taqダイプライマーサイクルシークエンシングキット(Applied Biosystems)を使用し決定した。決定した塩基配列の全長は3403塩基対であり、その配列は配列表配列番号2に記載した。GENBANK/EMBL DNA Data Baseを使用し、配列表配列番号2に記載した塩基配列を検索したが、同一の配列は存在しなかった。

(g) 遺伝子産物の解析

配列表配列番号2に記載した遺伝子塩基配列から予想される配列表配列番号1に記載したアミノ酸配列の親水、疎水性値をカイト・ドーリトル(Kyte・Doolittle)法(ジャーナル オブ モレキュラーバイオロジー(J. Mol. Biol.))、第157巻、105~132頁(1982))により算出し、図1に示す親水性、疎水性分布図を決定した。配列表配列番号1のアミノ酸533位から562位のC末端領域に膜結合型タンパク質に特徴的な20個以上の疎水性アミノ酸が連続する配列からなる疎水性領域が存在し、その配列を配列表配列番号7に示した。このような疎水性のアミノ酸が連続している配列は、既知のMMPsには見られない配列

である。

配列表配列番号1に記載したアミノ酸配列を公知の
MMPsのアミノ酸配列とその相同性を比較した結果、配列
表配列番号1に示したアミノ酸配列は、MMPsファミリー
5 と相同性を示した。特に、MMPsファミリーで非常に高度
に保存されている前駆体と活性型の切断部位および活性
部位はMT-MMPでもそれぞれ高い保存性を示した（配列表
配列番号1、アミノ酸88位～97位およびアミノ酸番号
112位～222位）。

10 実施例2 遺伝子発現

(a) 組織での発現

ヒト心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓、
各組織由来のポリ(A)⁺RNAをプロットしてあるメンブレ
ン ヒューマン マルチプル ティッシュ ノーザン プロ
15 ッツ(CLONTECH)に対し、³²P標識した実施例1(c)項に
記載したPCR産物Aをプローブとして用いてハイブリダ
イゼーションを行った。3×SSC(0.45M NaCl、0.045M
trisodiumcitrate-2H₂O、pH7.0)で湿らせたヒューマ
ン マルチプル ティッシュ ノーザン プロットのフィル
20 ターをプレハイブリダイゼーション溶液(0.75M NaCl、
2.5mM EDTA、0.5×Denhardt's溶液、50%Formamideおよ
び1%SDS含有20mM Tris-HCl緩衝液、pH7.5)中で穏や
かに攪拌しながら2～3時間プレハイブリダイズした。
次にハイブリダイゼーション溶液(プレハイブリダイゼ
25 ーション溶液に10% Sodium Dextran、50μg/ml変性サ

ケ精子DNAを加えた溶液)に熱変性したプローブを加え、
レハイブリダイゼーション溶液と交換し、43℃で1晩ハ
イブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーショ
ン完了後、0.1% SDS含有2×SSC溶液で洗浄した。次に
5 フィルターを0.1% SDS含有1×SSC溶液中に68℃、15分
間置いた。このフィルターを風乾した後、X線フィルム
(Kodak XR)と重ね70℃で1週間オートラジオグラフィ
ーを行った。MT-MMP遺伝子の転写産物のサイズは、何れ
の組織でも4.8kbであった。現像したX線フィルムをデ
ンシトメーターでトレースしシグナルの強度を測定した
10 結果、MT-MMP遺伝子は、調べた組織中、肺、胎盤、腎臓
で高い発現を認めた。

(b) 癌組織での発現

ヒト肺扁平上皮癌2例それぞれから正常組織と癌組織
15 を採取し、全RNAをグアニジン塩化セシウム法により
抽出した。10 μ gの該RNAそれぞれを1%アガロース電気
泳動後、ナイロンメンブレンにトランスファーし、実施
例1(c)項に記載した³²P標識したプローブを使用して
ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーシ
20 ョンおよびオートラジオグラフィのトレースは前項
(a)と同様に行った。いずれのヒト肺扁平上皮癌におい
ても癌組織(図4 T参照)での発現が正常組織(図4 N
参照)に比べ有意に高値を示した。

実施例3 モノクローナル抗体の調製

25 (a) 抗原ポリペプチドの調製

配列表配列番号 1 に記載した MT-MMP のアミノ酸配列中より他の MMP ファミリーとの相同性が低い特異的な配列として配列表配列番号 8 (配列表配列番号 1 アミノ酸番号 160 位 ~ 173 位の配列)、同 9 (配列表配列番号 1 アミノ酸番号 320 位 ~ 333 位の配列) および同 10 (配列表配列番号 1 アミノ酸番号 498 位 ~ 512 位の配列) に記載した配列 (以下それぞれポリペプチド A、ポリペプチド B およびポリペプチド C と略記する) を選択した。これらのポリペプチドをペプチド合成機 (ペプチドシンセサイザー 9600、
10 MilliGen/Biosearch) を用い Fmoc-BOP 法により合成し、N 末端にシステインを導入した。合成した各ペプチドは高速液体クロマトグラフィーにより精製した。

(b) 各ポリペプチドとキーホールリンベットヘモシアニンの複合体の調製

15 2 mg キーホールリンベットヘモシアニン (KLH) を 1 ml の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解したものと 1.85 mg N-(ϵ -maleimidocaproyloxy)succinimide を 200 μ l のジメチルホルムアミドに溶解したものと混合し、30℃、30 分間反応させた。ついで、上記の混合液を 0.1 M リン
20 酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した PD-10 (Pharmacia) でゲルろ過した。マレイミドが結合した KLH を分取し、1.5 ml 以下に濃縮した。マレイミドが結合した KLH に対し 50 倍モル量の前記 (a) で合成した各ポリペプチドを 1 ml の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解したものとをそれぞれ混
25 合し、4℃、20 時間インキュベートし、KLH-ポリペプ

チド複合体を調製した。

(c) 抗体産生細胞の調製

前項(b)で調製した3種類のポリペプチドA、ポリペ
5 プチドBおよびポリペプチドCとKLHとの複合体それぞ
れ250 μ gを完全フロインドアジュバントと共に8週令
Balb/c雌マウスに腹腔内投与し、初回免疫した。18日
後に0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)に溶解した各複合体200
10 μ gをそれぞれの初回免疫したマウスに腹腔内投与し、
追加免疫した。さらに32日後に追加免疫時と同様に各複
合体100 μ gを静脈内投与し、最終免疫とした。その3日
後に脾臓を摘出し、脾細胞懸濁液を調製した。

(d) 細胞融合

8-アザグアニン耐性ミエローマ細胞SP2(SP2/O-Ag
14)との融合は、オイ(Oi)らの方法(セレクトッドメソ
15 ッドインセルラーイムノロジー(Selected Method
in Cellular Immunology)、B. B. ミッシュェルとS. M.
シーギ編(ed. B. B. Mishell and S. M. Shiigi)、W. H.
フリーマンアンドカンパニー(W. H. Freeman and
Company)発行、351~372頁(1980))を若干改変して行っ
20 た。以下では、ポリペプチドA-KLH複合体で免疫した
マウス由来の有核脾細胞とミエローマ細胞SP2との融合
に関して詳述する。

前項(c)で調製した有核脾細胞(生細胞率100%)それ
ぞれとミエローマ細胞(生細胞率100%)とを5:1の比
25 率で以下の手順で融合した。ポリペプチドA脾細胞懸濁

- 液とミエローマ細胞をそれぞれRPMI1640培地で洗浄した。次に同じ培地に懸濁し、融合させるために有核脾細胞 3×10^8 個とミエローマ細胞 6×10^7 個を混合した。次に遠心分離により細胞を沈殿させ、上清を完全に吸引除去した。
- 5 沈殿した細胞に37℃に加温したPEG4000溶液（50%（w/v）ポリエチレングリコール4000含有RPMI1640培地）2.0mlを1分間で滴下し、1分間攪拌し、細胞を再懸濁、分散させた。次に37℃に加温したRPMI1640培地2.0mlを1分間で滴下した。この操作をさらに1回繰り返した後、
- 10 同培地14mlを2～3分間で常に攪拌しながら滴下し、細胞を分散させた。これを遠心分離し、上清を完全に吸引除去した。次にこの沈殿した細胞に37℃に加温したNS-1培地（除菌ろ過した15%（w/v）仔牛胎児血清（JRH Biosciences）含有RPMI1640培地）30mlを速やかに加え、大きい
- 15 細胞塊を注意深くピペティングで分散した。さらに同培地30mlを加えて希釈し、ポリスチレン製96穴マイクロウェルにウェル当り 6.0×10^5 個/0.1mlの細胞を加えた。細胞を加えた上記マイクロウェルを7%炭酸ガス/93%空気中で温度37℃、湿度100%で培養した。
- 20 ポリペプチドB-KLH複合体で免疫したマウス由来脾細胞の場合では、脾細胞 6.4×10^8 個とミエローマ細胞 1.28×10^8 個を混合し、上記で使用したPEG4000溶液、RPMI1640培地、NS-1培地をそれぞれ4.3ml、38.7ml、129ml用いた。ポリペプチドC-KLH複合体で免疫したマウス由来の脾細胞の場合、脾細胞 6.8×10^8 個とミエローマ
- 25

細胞 1.36×10^8 個を混合し、PEG4000溶液、RPMI1640培地、NS-1培地をそれぞれ4.5 μ l、40.5 μ l、135 μ l使用した。

(e) 選択培地によるハイブリドーマの選択的増殖

- 前項(d)の培養開始後翌日(1日目)、細胞にパスツールピペットでHAT培地(NS-1培地にヒポキサンチン(100 μ M)、アミノプテリン(0.4 μ M)およびチミジン(16 μ M)を加えた培地)2滴(約0.1 μ l)を加えた。2、3、5、8日目に培地の半分(約0.1 μ l)を新しいHAT培地で置き換え、11日目に培地の半分を新しいHT培地(アミノプテリン不含HAT培地)で置き換えた。14日目にハイブリドーマの生育が肉眼にて認められた全ウェルについて固相-抗体結合テスト法(ELISA)により陽性ウェルを調べた。すなわち、ポリスチレン性96穴プレートに抗原としたポリペプチドA、BおよびCそれぞれでコートし、次に洗浄用PBS(0.05% Tween20含有)を用いて洗浄して未吸着のペプチドを除いた。さらに各ウェルの未コート部分を1% BSAでブロックした。この各ウェルにハイブリドーマの生育が確認されたウェルの上清0.1 μ lを添加し、室温で約1時間静置した。
- 2次抗体として西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス免疫グロブリンを加え、さらに室温で約1時間静置した。次に基質である過酸化水素とオーフェニレンジアミンを加え、発色の程度をマイクロプレート用吸光度測定機(MRP-A4、東ソー)を用いて492nmの吸光度で測定した。

(f) ハイブリドーマのクローニング

前項(e)で得られた各抗原ペプチドに対する陽性ウェル中のハイブリドーマを、限界希釈法を用いてモノクローニ化した。すなわち、96穴マイクロウェルにハイブリドーマをウェル当り5個、1個、0.5個になるように希釈し、それぞれ36穴、36穴、24穴に加えた。5日目、12日目に全ウェルに約0.1 mlのNS-1培地を追加した。クローニング開始後約2週間で、肉眼的に十分なハイブリドーマの生育を認め、コロニー形成陰性ウェルが50%以上である群について(e)に記載したELISAを行った。調べた全ウェルが陽性でない場合、抗体陽性ウェル中のコロニー数が1個のウェルを4~6個選択し、再クローニングを行った。最終的に表1および表2にまとめて示したように各ポリペプチドA、ポリペプチドBまたはポリペプチドCに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマがそれぞれ12個、20個、9個得られた。

(g) ハイブリドーマの培養とモノクローナル抗体の精製

得られた各ハイブリドーマ細胞をNS-1培地で培養し、その上清から濃度10~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のモノクローナル抗体を得ることができた。また、得られたハイブリドーマを 10^7 個を予め1週間前にプリスタンで腹腔内投与したマウス(BALB/c系、雌、6週齢)に同じく腹腔内投与し、1~2週間後、腹水中からも4~7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のモノクローナル抗体を含む腹水を得ることができた。得られた腹水

を40%飽和硫酸アンモニウムで塩析後、IgGクラスの抗体をプロテインAアフィゲル(Bio-Rad)に吸着させ、0.1Mクエン酸緩衝液(pH5)で溶出することにより精製した。

5 (h) モノクローナル抗体のクラス、サブクラスの決定

前述したELISAに従い、各ポリペプチドA、ポリペプチドBまたはポリペプチドCをコートしたマイクロタイ
10 トレーションプレートに、(f)で得られたモノクローンの上清を加えた。次にPBSで洗浄後、アイソタイプ特異的ウサギ抗マウスIgG抗体(Zymed Lab.)を加えた。PBSにより洗浄後、西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG(H+L)を加え、基質として過酸化水素および2,2'-アジノージ(3-エチルベンゾチアゾリン酸)を用いて
15 クラス、サブクラスを決定した。

(i) 抗MT-MMPモノクローナル抗体の特異性

ヒト新生児線維芽細胞(NB1RGB)の培養上清中からそれぞれ精製した潜在型MMP-1(クリニカ キミカ アクタ
(Clin. Chim. Acta)、第219巻、1~14頁(1993))、潜在
20 型MMP-2(クリニカ キミカ アクタ(Clin. Chim. Acta)、第221巻、91~103頁(1993))および潜在型MMP-3(クリニカ キミカ アクタ(Clin. Chim. Acta)、第211巻、59~72頁(1992))、ヒト直腸癌細胞(Car-1)の培養上清から精製した潜在型MMP-7(キャンサー リサーチ(Cancer Res.)、
25 第50巻、7758~7764頁、(1990))、ヒト好中球より精製

した潜在型MMP-8 (バイオリジカル ケミストリー ホップ
セイラー (Biol. Chem. Hoppe-Seyler)、第371巻、サ
プルメント、295~304頁、(1990)) 並びにヒト線維芽細
胞腫株 (HT1080) の培養上清から精製した潜在型MMP-9
5 (ザ ジャーナル オブ バイオリジカル ケミストリー
(J. Biol. Chem)、第267巻、21712~21719頁、(1992))
をそれぞれ抗原として使用し、前述の(e)に記載した
ELISAによりヒトMT-MMPペプチドと陽性反応を示す5種
10 類の抗MT-MMPモノクローナル抗体 (モノクローン番号113
-5B7、113-15E7、114-1F1、114-2F2および118-3B1) の交
差反応性を調べた。

すなわち、ポリスチレン製96穴プレートを使用し、各
ウェルに精製した各MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP
-8およびMMP-9をそれぞれ50ng/Wellで加えコートした。
15 洗浄用PBSで洗浄し未吸着の抗原を除去した後、各ウェ
ルの未コート部分を3%スキムミルク含有PBSでブロッ
クした。この各ウェルに各抗MT-MMPモノクローナル抗体
それぞれを1 μ g/Wellで加え、室温で約1時間静置し
た。プレートを洗浄後、2次抗体としてペルオキシダー
20 ゼ標識ヤギ抗マウス免疫グロブリンを加えさらに室温で
約1時間反応させた。次に基質である過酸化水素とオー
フェニレンジアミンを加え、発色の程度をマイクロプレ
ート用吸光度測定機 (MRP-A4、東ソー) を用いて492nmの
吸光度で測定した。

25 その結果、表3に示したように、抗MT-MMPモノクロー

ナル抗体は何れも、供試したMT-MMP以外の精製MMPsと反応性を示さなかった。

表 1

	ポリペプチド	モノクローン番号	サブクラス／鎖
5	A	114-1F2	$\gamma 1 / \kappa$
		114-2F2	$\gamma 1 / \kappa$
		114-3H7	$\gamma 1 / \kappa$
		114-5E4	$\gamma 1 / \kappa$
		114-6G6	$\gamma 1 / \kappa$
		114-8D10	$\gamma 1 / \kappa$
		114-9H3	μ / κ
		114-15E8	$\gamma 1 / \kappa$
		114-16C11	$\gamma 1 / \kappa$
		114-18E4	$\gamma 1 / \kappa$
10		114-19F11	$\gamma 1 / \kappa$
		114-20H5	μ / κ
15	B	113-1E3	$\gamma 3 / \kappa$
		113-2E9	$\gamma 3 / \kappa$
		113-3F6	$\gamma 2b / \kappa$
		113-4H7	$\gamma 3 / \kappa$
		113-5B7	$\gamma 3 / \kappa$
		113-7C6	$\gamma 2b / \kappa$
		113-9G9	$\gamma 3 / \kappa$
		113-10F2	$\gamma 3 / \kappa$
		113-13G11	$\gamma 3 / \kappa$
		113-15E7	$\gamma 3 / \kappa$
		113-16H8	$\gamma 3 / \kappa$
		113-17G12	μ / κ
		113-19A10	μ / κ
		113-20G11	$\gamma 3 / \kappa$
		113-21H3	$\gamma 1 / \kappa$
20		113-26D3	μ / κ
		113-44C1	$\gamma 1 / \kappa$
		113-46B7	$\gamma 1 / \kappa$
		113-53G5	μ / κ
25		113-63E8	$\gamma 1 / \kappa$

表 2

ポリペプチド モノクローン番号 サブクラス / 鎖

5	C	118-3B1	γ 2b / κ
		118-6F3	γ 2b / κ
		118-8D11	γ 1 / κ
		118-9B11	γ 1 / κ
		118-13D11	α / κ
		118-18C12	γ 1 / κ
		118-20A3	γ 2b / κ
		118-25C3	γ 1 / κ
10		118-26F5	γ 3 / κ

表 3

モノクローン 番 号	交 差 反 応 性					
	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-8	MMP-9
113-5B7	—	—	—	—	—	—
113-15E7	—	—	—	—	—	—
114-1F2	—	—	—	—	—	—
114-2F2	—	—	—	—	—	—
118-3B1	—	—	—	—	—	—

— : 反応せず

実施例 4 遺伝子産物の発現と同定

実施例 1 (f) で構築した MT-MMP 遺伝子をクローン化した組換え pBluescript から EcoR I 切断により挿入断片を切出し、真核細胞用発現ベクター pSG5 (Stratagene) の
5 EcoR I サイトにクローニングした。該組換え pSG5 をヒト線維芽細胞腫株 HT1080 にリン酸カルシウム法によりトランスフェクションした。すなわち、蒸留水に 20 μ g の組換え pSG5、6.2 μ l の 2 M CaCl_2 を加え、次に 2 \times HBSP 溶液 (1.5 mM Na_2HPO_4 、10 mM KCl 、280 mM NaCl および 12 mM
10 Glucose 含有 50 mM HEPES 緩衝液、pH 7.1) をチューブの底に加え全量が 1 ml になるようにした。これを混合後、室温で 30 分程度放置し、沈殿形成を十分行った。沈殿をピペティングにより分散し、HT1080 細胞に滴下した後、 CO_2 インキュベーター中で約 4 時間インキュベートした。
15 次に培地を除き、15% グリセリン溶液を加え 1 ~ 3 時間処理した後、グリセリンを吸引除去、PBS で洗浄後、 ^{35}S - メチオニンを含む新鮮な培地を加えた。培養を継続し、細胞タンパク質を ^{35}S で標識した。因みに、HT1080 細胞における MT-MMP 遺伝子の発現はノーザンブロット分析で
20 は検出できない。

細胞を溶解緩衝液 (1% Triton X-100、1% bovine hemoglobin、1 mM iodoacetamide、0.2 U trypsin inhibitor、1 mM PMSF および 0.14 M NaCl 含有 0.01 M Tris-HCl 緩衝液、pH 8) 中で 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間インキュベ
25 トした。細胞溶解液を遠心分離し、上清を回収した。上

清に実施例 3 で得られたモノクローナル抗体をカップリングさせたセファロース-4B(Pharmacia)を加え、4℃で2時間攪拌しながらインキュベートし、免疫沈降を行った。免疫沈降には実施例 3 で得られたポリペプチド A

5 に対する12個のモノクローナル抗体のうち非特異的反応性の低いモノクローン番号114-1F2および114-2F2(受託番号FERM BP-4743)の2種類をそれぞれ使用した。次に、遠心分離により免疫沈降させたモノクローナル抗体をカップリングしたセファロース-4Bを沈殿させ、洗浄液

10 (1% Triton X-100、1% bovine hemoglobinおよび0.14M NaCl含有0.01M Tris-HCl、pH8)で3回洗浄し、最後に0.05M Tris-HCl緩衝液、pH6.8で洗浄した。この洗浄したモノクローナル抗体をカップリングしたセファ

15 ル緩衝液を加え、100℃で5分間加熱した後、SDSポリアクリルアミド電気泳動を行った。泳動後のゲルをX線フィルム(Kodak XR)と重ね-70℃で1週間オートラジオグラフィを行った後、現像したX線フィルムをデンストメーターでトレースしシグナルの強度を測定した。使用

20 した抗MT-MMPモノクローナル抗体モノクローン番号114-1F2および114-2F2はいずれも、63kDaのタンパク質を免疫沈降した。対照としたMT-MMP遺伝子を含まないベクター-pSG5のみをトランスフェクションした細胞では、抗MT-MMPモノクローナル抗体モノクローン番号114-1F2およ

25 び114-2F2で63kDaタンパク質は免疫沈降されなかった。

免疫沈降で検出されたタンパク質の分子量63kDaは、配列表配列番号1に記載したアミノ酸配列から算出される分子量65.78kDaとほぼ一致した。さらに、配列表配列番号1に記載したアミノ酸配列のアミノ酸13位から101位までを欠失した変異体MT-MMP発現プラスミドを作成し、前述と同様HT1080細胞にトランスフェクションし、免疫沈降を行った。変異体MT-MMP遺伝子を導入したHT1080細胞では、63kDaタンパク質は検出されず、55kDaタンパク質を検出した。この分子量は、導入した欠失から予想される分子量と一致した。

実験例

(a) MT-MMPの発現による潜在型MMP-2の活性化

実施例4で構築したMT-MMP遺伝子をクローン化した組換えpSG5あるいはコントロールとしてベクターpSG5単独を同じく実施例4に記載したリン酸カルシウム法によりHT1080細胞、あるいはマウス胎児由来線維芽細胞NIH3T3にトランスフェクションした。ただし、³⁵S-メチオニン含有新鮮培地の代わりに、通常の新鮮培地を使用した。なお、HT1080細胞およびNIH3T3細胞は、何れも潜在型MMP-2および潜在型MMP-9を分泌しており(図6中の66kDaおよび97.4kDaのバンドにそれぞれ相当)、また、MT-MMP遺伝子をトランスフェクションした細胞では、MT-MMPが発現していることを免疫沈降実験により確認した(実施例4参照)。

得られたトランスフェクタントを無血清培地中で24時

間培養し、回収した培養上清をザイモグラフィーに供試した。培養上清をSDSポリアクリルアミド電気泳動用緩衝液(非還元)と混和後4℃で一晩放置した後、1mg/mlのカゼイン含有10%ポリアクリルアミドゲルを用い、電
5 流20mA、4℃で電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルを2.5%Triton X-100含有ゼラチナーゼ用緩衝液(5mM CaCl_2 、1mM ZnSO_4 含有Tris-HCl、pH7.6)で15分間ゆっくり振盪させながら洗浄し、この操作を2回繰り返した。次にゲルを1%Triton X-100含有ゼラチナーゼ用緩
10 衝液中に浸し、37℃で一晩放置した。緩衝液を廃棄し、ゲルを0.02%クマシーブリリアントブルーR(50%メタノール-10%酢酸に溶解)で1時間染色後、脱色液(5%メタノール-7.5%酢酸)に浸し脱色した。

図6に示すように、MT-MMP遺伝子をトランスフェクションしたHT1080細胞では、新たに64kDaと62kDaのバンド
15 が生じ、潜在型MMP-2の活性化が確認された。この活性型MMP-2は、細胞を100μg/mlのコンカナバリンAで処理して誘導される活性型MMP-2分子と同じ分子量を示し、また抗MMP-2モノクローナル抗体と特異的に反応した。
20 この活性化は、ベクター単独をトランスフェクションしたコントロールでは観察されなかった。一方、潜在型MMP-9は、コントロールの細胞と同様に分子量の変化は認められず、活性化は認められなかった。このMT-MMPの
25 ランスフェクションしたNIH3T3細胞でも観察された。

(b) MT-MMP発現細胞膜画分による潜在型MMP-2の活性化

前項(a)の記載と同様にMT-MMP遺伝子をクローン化した組換えpSG5あるいはコントロールとしてベクターpSG5
5 単独をリン酸カルシウム法によりアフリカミドリザル腎由来細胞COS-1にトランスフェクションした。得られたトランスフェクタントからストロンジン(Strongin)らの方法(ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー(J. Biol. Chem.))、第268巻、14033~14039頁(1993))
10 に従い、細胞膜画分を調製した。

トランスフェクタントをPBSで洗浄後、遠心により細胞を集め8.5% Sucrose、50mM NaCl、10mM N-ethylmaleimide、10 μ g/ μ l aprotinin、1 μ g/ μ l pepstatin A、1 μ g/ μ l leupeptin、1mM phenyl -
15 methylsulfonyl fluoride含有25mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.4)に懸濁した。細胞懸濁液をDounce homogenizerで破碎し、破碎液を遠心分離(3000 \times g、10分間、4 $^{\circ}$ C)した。得られた上清をさらに超遠心分離(100,000 \times g、2時間)し、沈殿を50mM NaCl、10mM N-ethylmaleimide、10
20 μ g/ μ l aprotinin、1 μ g/ μ l pepstatin A、1 μ g/ μ l leupeptin、1mM phenylmethylsulfonyl fluoride含有25mM Tris-HCl緩衝液(pH7.4)に懸濁した。この懸濁液を段階的シヨ糖密度勾配遠心(20、30、50、60% Sucrose溶液、100,000 \times g、2時間、4 $^{\circ}$ C)で分画し、
25 生じた細胞膜画分のバンドを回収した。この画分を再度

超遠心分離($100,000 \times g$ 、2時間)により沈殿させた後、
0.1M CaCl_2 、0.25% Triton X-100含有25mM HEPES/
KOH(pH7.5)に懸濁し、タンパク質終濃度 $1 \sim 2 \text{ mg/ml}$ と
なるように調整した。この懸濁液を超遠心分離($100,000$
5 $\times g$ 、1.5時間、 4°C)し不溶残渣を除き得られた上清を
細胞膜画分とした。

ベクターpSG5単独またはMT-MMP遺伝子をトランスフェ
クションしたCOS-1細胞および無処理のCOS-1細胞からそ
れぞれ調製した細胞膜画分(タンパク質含量 $20 \mu\text{g}$)を
10 HT1080細胞の培養上清と 37°C で2時間インキュベートし
た。これら試料を用いて前項(a)に記載したザイモグラ
フィーを行った。

その結果、MT-MMP遺伝子をトランスフェクションした
COS-1細胞由来の細胞膜画分を用いた場合のみ、新たな
15 64kDa と 62kDa のバンドが出現し、HT1080細胞の培養上清
中に存在する潜在型MMP-2の活性化が観察された(図7参
照)。この潜在型MMP-2の活性化は、組換えTIMP-2の添加
により阻害された。この結果から、細胞膜上に発現した
MT-MMPによる潜在型MMP-2の活性化が示された。

20 (c) In vitroにおけるMT-MMP発現による浸潤能の促
進

細胞の浸潤能の測定は、ボイデン チャンバー(Boyden
Chamber)法(キャンサー リサーチ(Cancer Res.)、第47
巻、3239~3245頁(1987))を改変して行い、操作はバイ
25 オコート マトリゲル インベージョン チャンバー

(Becton Dickinson)の操作方法に従った。

前述の(a)の記載と同様にMT-MMP遺伝子をクローン化した組換えpSG5あるいはコントロールとしてベクターpSG5単独をリン酸カルシウム法によりHT1080細胞、あるいはNIH3T3細胞にトランスフェクションした。これらの宿主細胞はいずれも潜在型MMP-2を分泌している。得られたトランスフェクタントを0.1% BSA含有DMEM培地に懸濁し、 2×10^5 個の細胞をバイオコートマトリゲルインバージョンチャンバー中の未コードフィルター(ポアサイズ $8 \mu m$)あるいは予め膨潤させたマトリゲルコートフィルター上に接種した。24時間、 $37^\circ C$ 炭酸ガスインキュベーター中で培養した後、フィルターを10秒間メタノール中に浸し固定した。次にヘマトキシリンで3分間水洗後、エオジンで10秒間染色し、フィルター下面に浸潤した細胞数を光学顕微鏡下(400倍)で計測した。

MT-MMP遺伝子をトランスフェクションしたHT1080細胞およびNIH3T3細胞では、いずれもコントロールのベクター単独をトランスフェクションした細胞に比べ、2倍以上の浸潤した細胞が観察された(図8 マトリゲル参照)。すなわち、MT-MMPの発現により細胞の浸潤能が上昇したことが示された。また、この測定系に $10 \mu g/ml$ の組換えTIMP-2を添加すると明らかに細胞の浸潤能が抑制されることが認められた(図8 マトリゲル+rTIMP-2参照)。

25.

図面の簡単な説明

図 1 は、MT-MMPのアミノ酸配列のカイト・ドーリトル法による親水性、疎水性分布図である。

図 2 A、2 B、2 C、2 D、2 E、2 F、2 G、2 H
5 は、MT-MMPのアミノ酸配列と公知のMMPファミリー(MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MMP-10、MMP-11)のアミノ酸配列との配列上の相同性を比較した図である。各図中の記号は、それぞれアミノ酸を表し、AはAla、CはCys、DはAsp、EはGlu、FはPhe、GはGly、
10 HはHis、IはIle、KはLys、LはLeu、MはMet、NはAsn、PはPro、QはGln、RはArg、SはSer、TはThr、VはVal、WはTrp、YはTyrに対応する。これらの2 A～2 Hの図は一体となって1つの図を構成する。

図 3 は、ノーザンブロット分析による各種のヒト組織
15 中でのMT-MMP mRNAの発現を相対的に示したものである。

図 4 は、ノーザンブロット分析によるヒト肺扁平上皮癌2例の正常部および癌部におけるMT-MMP mRNAの発現を相対的に示したものである。

20 図 5 は、MT-MMP cDNA導入HT1080細胞中で発現したMT-MMPタンパク質を免疫沈降法により検出した結果を示したものである。図はデンストメータによるスキャンを示したものであり、黒塗り部分が抗MT-MMPモノクローナル抗体で免疫沈降したMT-MMPの位置を示す。

25 図 6 は、MT-MMP cDNA導入HT1080細胞およびMT-MMP

cDNA導入NIH3T3細胞の培養上清のザイモグラフィーにより、MT-MMPの発現による潜在型MMP-2の活性化を示したものである。

5 図7は、MT-MMP cDNA導入COS-1細胞の細胞膜画分による潜在型MMP-2の活性化をザイモグラフィーにより示したものである。

図8は、MT-MMPの発現による細胞の浸潤能の促進を一部改変したボイデン・チャンバー(Boyden Chamber)法により示したものである。

10

15

20

25

【配列表 1】

配列番号：1

配列の長さ：582

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖上

配列の種類：タンパク質

配列

Met Ser Pro Ala Pro Arg Pro Ser Arg Cys Leu Leu Leu Pro Leu			
1	5	10	15
Leu Thr Leu Gly Thr Ala Leu Ala Ser Leu Gly Ser Ala Gln Ser			
	20	25	30
Ser Ser Phe Ser Pro Glu Ala Trp Leu Gln Gln Tyr Gly Tyr Leu			
	35	40	45
Pro Pro Gly Asp Leu Arg Thr His Thr Gln Arg Ser Pro Gln Ser			
	50	55	60
Leu Ser Ala Ala Ile Ala Ala Met Gln Lys Phe Tyr Gly Leu Gln			
	65	70	75
Val Thr Gly Lys Ala Asp Ala Asp Thr Met Lys Ala Met Arg Arg			
	80	85	90
Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp Lys Phe Gly Ala Glu Ile Lys Ala			
	95	100	105
Asn Val Arg Arg Lys Arg Tyr Ala Ile Gln Gly Leu Lys Trp Gln			
	110	115	120
His Asn Glu Ile Thr Phe Cys Ile Gln Asn Tyr Thr Pro Lys Val			
	125	130	135
Gly Glu Tyr Ala Thr Tyr Glu Ala Ile Arg Lys Ala Phe Arg Val			
	140	145	150
Trp Glu Ser Ala Thr Pro Leu Arg Phe Arg Glu Val Pro Tyr Ala			
	155	160	165

【配列表 2】

配列番号 : 1 (つづき)

Tyr Ile Arg Glu Gly His Glu Lys Gln Ala Asp Ile Met Ile Phe	170	175	180
Phe Ala Glu Gly Phe His Gly Asp Arg Thr Ala Phe Asp Gly Glu	185	190	195
Gly Gly Phe Leu Ala His Ala Tyr Phe Pro Gly Pro Asn Ile Gly	200	205	210
Gly Asp Thr His Phe Asp Ser Ala Glu Pro Trp Thr Val Arg Asn	215	220	225
Glu Asp Leu Asn Gly Asn Asp Ile Phe Leu Val Ala Val His Glu	230	235	240
Leu Gly His Ala Leu Gly Leu Glu His Ser Ser Asp Pro Ser Ala	245	250	255
Ile Met Ala Pro Phe Tyr Gln Trp Met Asp Thr Glu Lys Phe Val	260	265	270
Leu Pro His Tyr Asp Pro Arg Gly Ile Gln Gln Leu Tyr Gly Gly	275	280	285
Lys Gln Gly Ser Pro Pro Arg Cys Pro Leu Asn Pro Gly Leu Pro	290	295	300
Pro Gly Leu Leu Phe Leu Ile Asn Pro Lys Asn Pro Thr Tyr Gly	305	310	315
Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe Asp Thr Val Ala Met Leu Arg	320	325	330
Gly Glu Met Phe Asp Phe Lys Lys Arg Trp Phe Trp Arg Val Arg	335	340	345
Asn Asn Gln Val Met Asp Gly Tyr Pro Met Pro Ile Gly Gln Phe	350	355	360
Trp Arg Gly Leu Pro Ala Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Glu Arg Lys	365	370	375

【配列表 3】

配列番号：1（つづき）

Asp Gly Lys Phe Val Phe Phe Lys Gly Asp Lys His Trp Val Phe	380	385	390
Asp Glu Ala Ser Leu Glu Pro Gly Tyr Pro Lys His Ile Lys Glu	395	400	405
Leu Gly Arg Gly Leu Pro Thr Asp Lys Ile Asp Ala Ala Leu Phe	410	415	420
Trp Met Pro Asn Gly Lys Thr Tyr Phe Phe Arg Gly Asn Lys Tyr	425	430	435
Tyr Arg Phe Asn Glu Glu Leu Arg Ala Val Asp Ser Glu Tyr Pro	440	445	450
Lys Asn Ile Lys Val Trp Glu Gly Ile Pro Glu Ser Pro Arg Gly	455	460	465
Ser Phe Met Gly Ser Asp Glu Val Phe Thr Tyr Phe Tyr Lys Gly	470	475	480
Asn Lys Tyr Trp Lys Phe Asn Asn Gln Lys Leu Lys Val Glu Pro	485	490	495
Gly Tyr Pro Lys Ser Ala Leu Arg Asp Trp Met Gly Cys Pro Ser	500	505	510
Gly Gly Arg Pro Asp Glu Gly Thr Glu Glu Glu Thr Glu Val Ile	515	520	525
Ile Ile Glu Val Asp Glu Glu Gly Gly Gly Ala Val Ser Ala Ala	530	535	540
Ala Val Val Leu Pro Val Leu Leu Leu Leu Leu Val Leu Ala Val	545	550	555
Gly Leu Ala Val Phe Phe Phe Arg Arg His Gly Thr Pro Arg Arg	560	565	570
Leu Leu Tyr Cys Gln Arg Ser Leu Leu Asp Lys Val	575	580	

【配列表 4】

配列番号：2

配列の長さ：3403

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：ヒト

組織の種類：胎盤

【配列表 5】

配列番号 : 2 (つづき)

AGTTCACTGCCTACC	GAAGACAAAGGCGCC	CCGAGGGAGTGGCGG	TGCGACCCCAGGGCG	60
TGGGCCCCGCGCGG	AGCCACACTGCCCCG	CTGACCCGGTGGTCT	CGGACCATGTCTCCC	120
			MetSerPro	
			/	
GGCCCAAGACCTCC	CGTTGTCTCCTGCTC	CCCCTGCTCAGGCTC	GGCACC GCGCTCGCC	180
AlaProArgProSer	ArgCysLeuLeuLeu	ProLeuLeuThrLeu	GlyThrAlaLeuAla	
5	10	15	20	
TCCCTCGGCTCGGCC	CAAAGCAGCAGCTTC	AGCCCCGAAGCCTGG	CTACAGCAATATGGC	240
SerLeuGlySerAla	GlnSerSerSerPhe	SerProGluAlaTrp	LeuGlnGlnTyrGly	
25	30	35	40	
TACCTGCCTCCCCGG	GACCTACGTACCCAC	ACACAGCGCTCACCC	CAGTCACTCTCAGCG	300
TyrLeuProProGly	AspLeuArgThrHis	ThrGlnArgSerPro	GlnSerLeuSerAla	
45	50	55	60	
GCCATCGCTGCCATG	CAGAAGTTTACGGC	TTGCAAGTAACAGGC	AAAGCTGATGCAGAC	360
AlaIleAlaAlaMet	GlnLysPheTyrGly	LeuGlnValThrGly	LysAlaAspAlaAsp	
65	70	75	80	
ACCATGAAGGCCATG	AGGCGCCCCCGATGT	GGTGTTCAGACAAG	TTTGGGGCTGAGATC	420
ThrMetLysAlaMet	ArgArgProArgCys	GlyValProAspLys	PheGlyAlaGluIle	
85	90	95	100	
AAGGCCAATGTTTCA	AGGAAGCGCTACGCC	ATCCAGGGTCTCAAA	TGGCAACATAATGAA	480
LysAlaAsnValArg	ArgLysArgTyrAla	IleGlnGlyLeuLys	TrpGlnHisAsnGlu	
105	110	115	120	
ATTACTTTCTGCATC	CAGAATTACACCCCC	AAGGTGGGCGAGTAT	GCCACATACGAGGCC	540
IleThrPheCysIle	GlnAsnTyrThrPro	LysValGlyGluTyr	AlaThrTyrGluAla	
125	130	135	140	
ATTCGCAAGGCGTTC	CGCGTGTGGGAGAGT	GCCACACCACTGCGC	TTCCGCGAGGTGCCC	600
IleArgLysAlaPhe	ArgValTrpGluSer	AlaThrProLeuArg	PheArgGluValPro	
145	150	155	160	
TATGCCTACATCCGT	GAGGGCCATGAGAAG	CAGGCCGACATCATG	ATCTTCTTTGCCGAG	660
TyrAlaTyrIleArg	GluGlyHisGluLys	GlnAlaAspIleMet	IlePhePheAlaGlu	
165	170	175	180	

【配列表 6】

配列番号：2（つづき）

GGCTTCATGGCGAC	AGGACGGCCTTCGAT	GCTGAGGGCGGCTTC	CTGGCCCATGCCTAC	720
GlyPheHisGlyAsp 185	ArgThrAlaPheAsp 190	GlyGluGlyGlyPhe 195	LeuAlaHisAlaTyr 200	
TTCCCAGGGCCCAAC	ATTGGAGCGAGACAC	CACCTTGACTCTGCC	GAGCCTTGGACTGTC	780
PheProGlyProAsn 205	IleGlyGlyAspThr 210	HisPheAspSerAla 215	GluProTrpThrVal 220	
AGGAATGAGGATCTG	AATCGAAATGACATC	TTCCTGGTGGCTGTG	CACGAGCTGGGCCAT	840
ArgAsnGluAspLeu 225	AsnGlyAsnAspIle 230	PheLeuValAlaVal 235	HisGluLeuGlyHis 240	
GCCCTGGGGCTCGAG	CATTCCAGTGACCCC	TCGGCCATCATGGCA	CCCTTTTACCAGTGG	900
AlaLeuGlyLeuGlu 245	HisSerSerAspPro 250	SerAlaIleMetAla 255	ProPheTyrGlnTrp 260	
ATGGACACGGAAAAA	TTGTGCTTCCCCAT	TATGACCCCCGGGGC	ATCCAGCAACTTTAT	960
MetAspThrGluLys 265	PheValLeuProHis 270	TyrAspProArgGly 275	IleGlnGlnLeuTyr 280	
GGGGGTAAGCAAGGT	TCCCCACCAAGATGC	CCCCTCAACCCAGGA	CTACCTCCCGGCCTT	1020
GlyGlyLysGlnGly 285	SerProProArgCys 290	ProLeuAsnProGly 295	LeuProProGlyLeu 300	
CTGTTCTCTGATAAAC	CCCCAAAACCCACC	TATGGGCCCAACATC	TGTGACGGGAACTTT	1080
LeuPheLeuIleAsn 305	ProLysAsnProThr 310	TyrGlyProAsnIle 315	CysAspGlyAsnPhe 320	
GACACCGTGGCCATG	CTCCGAGGGGAGATG	TTTGACTTCAAGAAG	CGCTGGTTCTGGCGG	1140
AspThrValAlaMet 325	LeuArgGlyGluMet 330	PheAspPheLysLys 335	ArgTrpPheTrpArg 340	
GTGAGGAATAACCAA	GTGATGGATGGATAC	CCAATGCCCATTCGC	CAGTTCTGGCGGGGC	1200
ValArgAsnAsnGln 345	ValMetAspGlyTyr 350	ProMetProIleGly 355	GlnPheTrpArgGly 360	
CTGCCTGCGTCCATC	AACACTGCCTACGAG	AGGAAGGATGGCAAA	TTCGTCTTCTTCAAA	1260
LeuProAlaSerIle 365	AsnThrAlaTyrGlu 370	ArgLysAspGlyLys 375	PheValPhePheLys 380	
GGAGACAAGCATTGG	GTGTTTGATGAGGCG	TCCCTGGAACCTGGC	TACCCCAAGCACATT	1320
GlyAspLysHisTrp 385	ValPheAspGluAla 390	SerLeuGluProGly 395	TyrProLysHisIle 400	

【配列表 7】

配列番号 : 2 (つづき)

AAGGAGCTGGGCGGA	GGGCTGCCTACCGAC	AAGATTGATGCTGCT	CTCTTCTGGATGCCC	1380
LysGluLeuGlyArg 405	GlyLeuProThrAsp 410	LysIleAspAlaAla 415	LeuPheTrpMetPro 420	
AATGGAAAGACCTAC	TTCTTCCGTGGAAAC	AAGTACTACCGTTTC	AACGAAGAGCTCAGG	1440
AsnGlyLysThrTyr 425	PhePheArgGlyAsn 430	LysTyrTyrArgPhe 435	AsnGluGluLeuArg 440	
GCAGTGGATAGCGAG	TACCCCAAGAACATC	AAAGTCTGGGAAGGG	ATCCCTGAGTCTCCC	1500
AlaValAspSerGlu 445	TyrProLysAsnIle 450	LysValTrpGluGly 455	IleProGluSerPro 460	
AGAGGTCATTCATG	GGCAGCGATGAAGTC	TTCACTTACTTCTAC	AAGGGGAACAAATAC	1560
ArgGlySerPheMet 465	GlySerAspGluVal 470	PheThrTyrPheTyr 475	LysGlyAsnLysTyr 480	
TGGAAATTCAACAAC	CAGAAGCTGAAGGTA	GAACCGGGCTACCCC	AAGTCAGCCCTGAGG	1620
TrpLysPheAsnAsn 485	GlnLysLeuLysVal 490	GluProGlyTyrPro 495	LysSerAlaLeuArg 500	
GACTGGATGGGCTGC	CCATCGGGAGGCCGG	CCGGATGAGGGGACT	GAGGAGGAGACGGAG	1680
AspTrpMetGlyCys 505	ProSerGlyGlyArg 510	ProAspGluGlyThr 515	GluGluGluThrGlu 520	
GTGATCATCATTTGAG	GTGGACGAGGAGGGC	GGCGGGCGGTGAGC	GCGGCTGCCGTGGTG	1740
ValIleIleIleGlu 525	ValAspGluGluGly 530	GlyGlyAlaValSer 535	AlaAlaAlaValVal 540	
CTGCCCCTGCTGCTG	CTGCTCCTGGTGCTG	GCGGTGGGCCTTGCA	GTCTTCTTCTTCAGA	1800
LeuProValLeuLeu 545	LeuLeuLeuValLeu 550	AlaValGlyLeuAla 555	ValPhePhePheArg 560	
CGCCATGGGACCCCC	AGCGGACTGCTCTAC	TGCCAGCGTTCCCTG	CTGGACAAGGTCTGA	1860
ArgHisGlyThrPro 565	ArgArgLeuLeuTyr 570	CysGlnArgSerLeu 575	LeuAspLysVal... 580	
CGCCCATCGCCCGGC	CCGCCACTCCTACC	ACAAGGACTTTGCCT	CTGAAGGCCACTGGC	1920
AGCAGGTGGTGGTGG	GTGGGCTGCTCCCAT	CGTCCCAGCCCCCT	CCCCGCAGCCTCCTT	1980

【配列表 8】

配列番号 : 2 (つづき)

GCTTCTCTGTCCC CTGGCTGGCCTCCTT CACCCTGACCGCCTC CCTCCCTCCTGCCCC 2040

GGCATTGCATCTTCC CTAGATAGGTCCCCT GAGGGCTGAGTGGGA GGGCGGCCCTTTCCA 2100

GCCTCTGCCCTCAG GGGAACCTGTAGCT TTGTGTCTGTCCAGC CCCATCTGAATGTGT 2160

TGGGGGCTCTGCACT TGAAGGCAGGACCCT CAGACCTCGCTGGTA AAGGTCAAATGGGGT 2220

CATCTGCTCCTTTTC CATCCCCTGACATAC CTTAACCTCTGAACT CTGACCTCAGGAGGC 2280

TCTGGGGAAGTCCAG CCCTGAAAGCCCCAG GTGTACCCAATTGGC AGCCTCTCACTACTC 2340

TTTCTGGCTAAAAGG AATCTAATCTTGTG AGGGTAGAGACCCTG AGACAGTGTGAGGGG 2400

GTGGGGACTGCCAAG CCACCCTAAGACCTT GGGAGGAAACTCAG AGAGGCTCTTCGTTG 2460

CTCAGTCAGTCAAGT TCCTCGGAGATCTTC CTCTGCCTCACCTAC CCCAGGGAAGTTCCA 2520

AGGAAGGAGCCTGAG CCACTGGGGACTAAG TGGGCAGAAGAAACC CTTGGCAGCCCTGTG 2580

CCTCTCGAATGTTAG CTTGGATGGGGCTT TCACAGTTAGAAGAG CTGAAACCAGGGGTG 2640

【配列表 9】

配列番号 : 2 (つづき)

CAGCTGTCAGGTAGG GTGGGGCCGGTGGGA GAGGCCCGGCTCAGA GCCCTGGGGGTGAGC 2700

CTTAAGGCCACAGAG AAAGAACCTTGCCCA AACTCAGGCAGCTGG GGCTGAGGCCCAAAG 2760

GCAGAACAGCCAGAG GGGGCAGGAGGGGAC CAAAAAGGAAATGA GGACGTGCAGCAGCA 2820

TTGGAAGGCTGGGGC CCGGCAGCCAGGTTA AAGCTAACAGGGGGC CATCAGGGTGGGCTT 2880

GTGGAGCTCTCAGGA AGGGCCCTGAGGAAG GCACACTTGCTCCTG TTGGTCCCTGTCCTT 2940

GCTGCCCAGGCAGGG TGGAGGGGAAGGGTA GGGCAGCCAGAGAAA GGAGCAGAGAAGGCA 3000

CACAAACGAGGAATG AGGGGCTTCACGAGA GGCCACAGGGCCTGG CTGGCCACGCTGTCC 3060

CGGCCTGCTACCAT CTCAGTGAGGGACAG GAGCTGGGGCTGCTT AGGCTGGGTCCACGC 3120

TTCCCTGGTGCCAGC ACCCCTCAAGCCTGT CTCACCACTGGCCTG CCCTCTCGCTCCCCC 3180

ACCCAGCCCACCCAT TGAAGTCTCCTTGGG TCCCAAAGGTGGGCA TGGTACCGGGGACTT 3240

GGGAGAGTGAGACCC AGTGGAGGGAGCAAG AGGAGAGGGATGTGG GGGGGTGGGGCACGG 3300

GTAGGGGAATGGGG TGAACGGTGCTGGCA GTTCGGCTAGATTTC TGTCTTGTITGTTTT 3360

TTTGTTTTGTTTAAAT GTATATTTTTATTAT AATTATTATATAT

【配列表 1 0】

配列番号：3

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp

1 5

【配列表 1 1】

配列番号：4

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Gly Asp Ala His Phe Asp Asp Asp Glu

1 5

【配列表 1 2】

配列番号：5

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CC(C/A)(C/A)G(G/A/C)TG(T/C)(C/G) G(G/A/C)(G/A)(A/T)(G/C/T)CC(T/A)CA

【配列表 1 3】

配列番号：6

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

(T/C)TC(G/A)T(C/C)(G/A/C)TC(G/A) TC(G/A)AA(G/A)TG(G/A)(G/A)
 (C/A/T)(C/A)TC(T/C)

【配列表 1 4】

配列番号：7

配列の長さ：27

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Gly	Gly	Gly	Ala	Val	Ser	Ala	Ala	Ala	Val	Val	Leu	Pro	Val	Leu
1				5					10					15
Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Ala	Val	Gly	Leu	Ala	Val	Phe	Phe	Phe
				20					25					

【配列表 1 5】

配列番号：8

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Arg	Glu	Val	Pro	Tyr	Ala	Tyr	Ile	Arg	Glu	Gly	His	Glu	Lys
1				5					10				

【配列表 16】

配列番号：9

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Gly Asn Phe Asp Thr Val Ala Met Leu Arg Gly Glu Met
 1 5 10

【配列表 17】

配列番号：10

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Pro Lys Ser Ala Leu Arg Asp Trp Met Gly Cys Pro Ser Gly Gly
 1 5 10 15

請 求 の 範 囲

1. 配列表配列番号 1 に示されているアミノ酸配列を有するタンパク質。
2. 配列表配列番号 1 に示されているアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする配列表配列番号 2 に示されている塩基配列を有する DNA。
3. 配列表配列番号 2 に示されている塩基配列を有する DNA 配列を含有し、配列表配列番号 1 に示されているタンパク質を発現するプラスミド。
4. 配列表配列番号 2 に示されている塩基配列を有する DNA 配列を含有し、配列表配列番号 1 に示されているタンパク質を発現するプラスミドを有する宿主細胞。
5. 配列表配列番号 1 に示されているアミノ酸配列を有するタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体。

20

25

Fig. 1

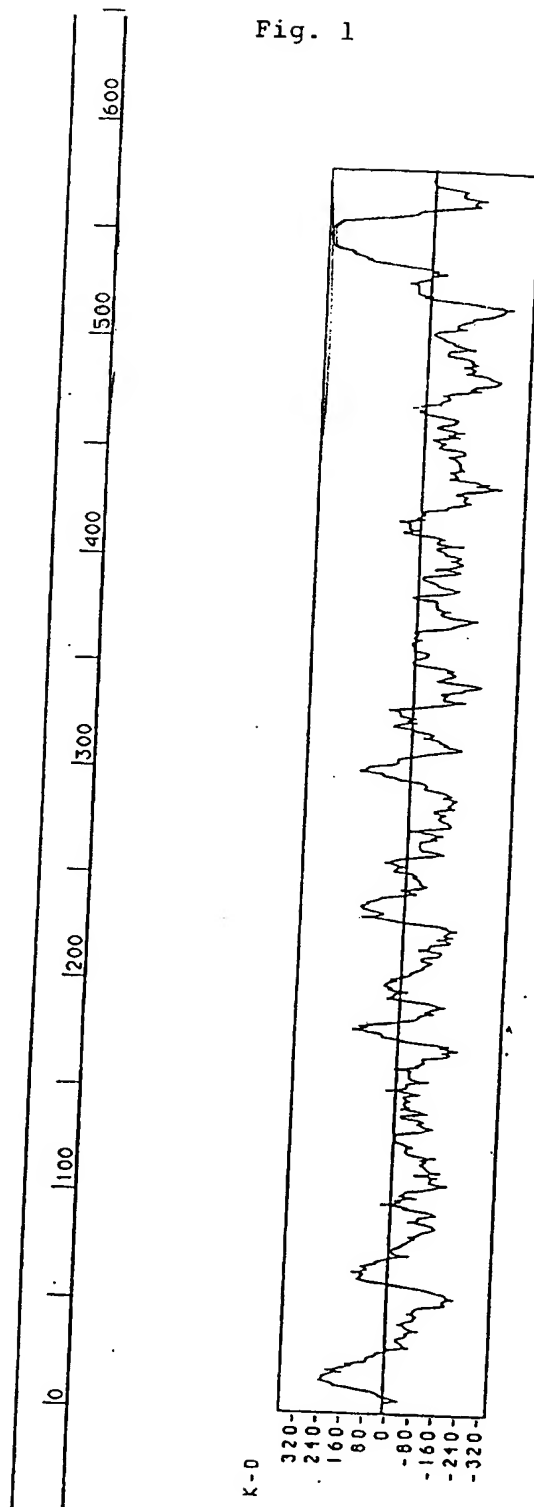


Fig. 2A

MMP-11	MAPAAWLRSA	AARALLPPML	LLLLQPPPLLARA	33
MMP-1	MHS.....FPPL	LLLLFWGVVS	HSFPATLETQ	37
MMP-8	MFSLKTL...PFL	LLLVHVQISKA	FPVSSKEKNT	36
MMP-10	MMHL.....AFL	VLLCLPVCSA	YPLSGAAKEE	37
MMP-3	MKSL.....PIL	LLLCVAVCSA	YPLDGAARGE	37
MMP-9	MSLWQP....LVLVLLV	LGCCFAAPRQ	RQSTLVLFPG	43
MMP-2AP..	..SPIIKFPG	19
MMP-7	MR.....LTVLCAV	CLLPGSLALP	LPQEAGGMSE	33
MT-MMP	MSPAP.....RPSR	CLLLPLLLTG	TALASLGSAQ	38
Consensus	M.....P.L	LLL.....	50
MMP-11	LPDVBHHL..	...HAERR.G	PQPWHAALPS	SP...APAPA	74
MMP-1	L-EKYNNLKN	DGRQVEKRRN	SGPVVEKLKQ	MQEFFGLKVT	86
MMP-8	L-EKFYQLPS	NQYQSTRKNG	TNVIVEKLKE	MQRFFGLNVT	85
MMP-10	L-EKYNNLEK	DVKQFRRK-D	SNLIVKKIQG	MQKFLGLEVT	85
MMP-3	L-ENYDCLKK	DVKQFVRRKD	SGPVVKKIRE	MQKFLGLEVT	86
MMP-9	LAEEYLYRYG	YTRVAEMRGE	SKSLGPALLL	LQQLSLPET	93
MMP-2	LAVQYLNTF.	YGCPE-SCN	LFVLKDTLKK	MQKFFGLPQT	67
MMP-7	QAQDYLKRF.	YLYDSETK-N	ANSLEAKLKE	MQKFFGLPIT	81
MT-MMP	L-QQYGYLPP	GDLRTHQRS	PQSLSAIAA	MQKFGQLQVT	87
Consensus	L-E.Y...L..E....KL..	MQKF.GL.VT	100
				GKLD..TL..	

Fig. 2B

MMP-11	LRPPRCGVDP	·PSDGLSARN	RQKRFVLSGG	RWEKTDLTyr	ILRFPWQLVQ	123
MMP-1	MKQPRCGVPD	·VAQ·FVL·	·····TE·GNP	RWEQTHLTyr	IENYTPDLPR	127
MMP-8	MKKPRCGVPD	·SGG·FML·	·····TP·GNP	KWERTNLTyr	IRNYTPQLSE	126
MMP-10	MRKPRCGVPD	·VGH·FSS·	·····FP·GMP	KWRKTHLTyr	IVNYTPDLPR	126
MMP-3	MRKPRCGVPD	·VGH·FRT·	·····FP·GIP	KWRKTHLTyr	IVNYTPDLPK	127
MMP-9	MRTPRCGVPD	·LGR·FQT·	·····FE·GDL	KWHHNITYW	IQNYSEDLP	134
MMP-2	MRKPRCGNPD	·VAN·YNF·	·····FP·RKP	KWDKNQITyr	IIGYTPDLDP	108
MMP-7	MQKPRCGVPD	·VAE·YSL·	·····FP·NSP	KWTSKVVTyr	IVSYTRDLPH	122
MT-MMP	MRRPRCGVPD	KFGAEIKANV	RRKRYAIQGL	KWQHNEITFC	IQNYTPKVGE	137
Consensus	MRKPRCGVPD	·VG·F·	·····FP·G·P	KW...T.LTyr	I.NYTPDLP	150
MMP-11	EQVRQTMAEA	LKVWSDVTPL	TFTEV·	·····HEGRADI	MIDFARYWDG	165
MMP-1	ADVDHAIEKA	FQLWSNVTP	TFTKV·	·····SEGQADI	MISFVRGDHR	169
MMP-8	AEVERAIEKA	FELWSVASPL	IFTRI·	·····SQGEADI	NIAFYQRDHC	168
MMP-10	DAVDSAIEKA	LKVWEEVTPL	TF SRL·	·····YEGEADI	MISFAVKEHG	168
MMP-3	DAVDSAVEKA	LKVWEEVTPL	TF SRL·	·····YEGEADI	MISFAVREHG	169
MMP-9	AVIDDAFARA	FALWSAVTPL	TFTRV·	·····YSRDADI	VIQFGVAEHG	176
MMP-2	ETVDDAFARA	FQWSDVTPL	RFSRI·	·····HDGEADI	MINFGRWEHG	150
MMP-7	ITVDRLVSKA	LNMWGKEIPL	HFRKV·	·····VWGTADI	MIGFARGAHG	164
MT-MMP	YATYEAIRKA	FRWESATPL	RFREVPYAYI	REGHEKQADI	MIFFAEGFHG	187
Consensus	..VD.A..KA	F.VWS.VTPL	TF.RV·	·····EG.ADI	MI.FA...HG	200

Fig. 2C

MMP·11	DDLPGDGG	ILAHAFPPKT	HREGDVHFDY	DETWTIGDDQ	GTD	208
MMP·1	DNSPFDGPGG	NLAHAFQPGP	GIGGDAHFE	HERWTNNFT	EYN	211
MMP·8	DNSPFDGPGG	ILAHAFQPGQ	GIGGDAHFDA	EETWTNTSA	NYN	210
MMP·10	DFYSFDGPGH	SLAHAYPPGP	GLYGDIHFDD	DEKWTEDAS	GTN	210
MMP·3	DFYPFDDGPGN	VLAHAYAPGP	GINGDAHFD	DEQWTKDIT	GTN	211
MMP·9	DGYPFDDGKDG	LLAHAFPPGP	GIQGDHAFDD	DELWSLGK	VVPTRFNGA	225
MMP·2	DGYPFDDGKDG	LLAHAFAPGT	GVGDSHFDD	DELWTLGEG	QVVRVKYGNA	199
MMP·7	DSYPFDDGPGN	TLAHAFAPGT	GLGGDAHFE	DERWTDGSSL	GIN	207
MT·MMP	DRTAFDGE	FLAHAYFPGP	NIGGDTHFDS	AEPWTVRNE	DLN	229
Consensus	D.YPFDDGPGG	.LAHAF.PGP	GIGGDAHFD.	DE.WT	.N	250
MMP·11	208
MMP·1	211
MMP·8	210
MMP·10	210
MMP·3	211
MMP·9	DGAACHFPFI	FEGRSYSACT	TDGRSDGLPW	CSTTANYDTD	DRFQFCPSE	275
MMP·2	DGEYCKFPFL	FNGKEYNSCT	DTGRSDGFLW	CSTTYNFEKD	QKYQFCPHEA	249
MMP·7	207
MT·MMP	229
Consensus	300

Fig. 2D

MMP-11		208
MMP-1		211
MMP-8		210
MMP-10		210
MMP-3		211
MMP-9		325
MMP-2	LYTRDGNADG	KPCQFPFIFQ	GQSYSACTTD	GRSDGYRWCA	TTANYDRDKL		299
MMP-7	LFTMGNAEG	QPCKFFFRFQ	GTSYDSCTTE	GRTDGYRWCG	TTEDYDRDKK		207
MT-MMP		229
Consensus		350

[illegible]

MMP·11	L	LQVAA·HEFG	HVLGLQHTTA	AKALMSAFY·	237
MMP·1	L	HRVAA·HEL	HSLGLSHSTD	IGALMYPY·	240
MMP·8	L	FLVAA·HEFG	HSLGLAHSSD	PGALMYPNY·	239
MMP·10	L	FLVAA·HEL	HSLGLFHSAN	TEALMYP·LYN	240
MMP·3	L	FLVAA·HEIG	HSLGLFHSAN	TEALMYP·LYH	241
MMP·9	TSNFDSDKKW	GFCPDQGYSL	FLVAA·HEFG	HALGLDHSSV	PEALMYP·MY·	423	
MMP·2	TANYDDDRKW	GFCPDQGYSL	FLVAA·HEFG	HAMGLEHSQD	PGALMAPIY·	396	
MMP·7	FLYAA·THELG	HSLGMGHSSD	PNAV·MYPTY·	236	
MT·MMPGNDI	FLVAV·HEL	HALGLEHSSD	PSAIMAPFY·	261	
ConsensusL	FLVAA·HE·G	HSLGL·HS·D	P·ALMYP·Y·	450	
MMP·11	TF·RYPLSL	SPDDCRGVQH	LYG·	258	
MMP·1	TF·SGDVQL	AQDDIDGIQA	IYG·	261	
MMP·8	AFRETSNYSL	PQDDIDGIQA	IYG·	262	
MMP·10	SFTELAQFRL	SQDDVNGIQS	LYG·	263	
MMP·3	SLTDLTRFRL	SQDDINGIQS	LYG·	264	
MMP·9	RF·TEGPPL	HKDDVNGIRH	LYGPRPEPEP	RPPTTTTPQP	TAPPTVCPTG	471	
MMP·2	TY·TKNFRL	SQDDIKGIQE	LYG·	417	
MMP·7	NGDPQNFKL	SQDDIKGIQK	LYGKRSNSRK	K·	267	
MT·MMP	QWMDTEKFVL	PHYDPRGIQQ	LYGKQGSPP	RCPLNPGLPP	GLLFLINPKN	311	
Consensus	.F.....F.L	SQDDI·GIQ·	LYG·	500	

Fig. 2E

Fig. 2E

Fig. 2F

291	339
278	324
279	325
289	335
290	336
516	563
440	487
267	267
361	410
550	500

7/15

Fig. 2G

MMP-11	P-SPVDAAFE	·DAQGHIWFF	QGAQYWVYDG	EKPVLG···P	APL·TELGLV	383
MMP-1	P-NGLEAAZE	FADRDEVRRF	KGNKYWAVQG	QNVLHG··YP	KDIYSSFGFP	371
MMP-8	P-TGIQAAYE	DFDRDLIFLF	KGNQYWALSG	YDILQG··YP	KDI·SNYGFP	371
MMP-10	P-SYLDAAZE	VNSRDTVFI	KGNEFWAIRG	NEVQAG··YP	RGI·HTLGF	381
MMP-3	P-SGVDAAYE	VTSKDLVFIF	KGNQFWAIRG	NEVRAG··YP	RGI·HTLGF	382
MMP-9	P-RKLDVFE	EPLSKKLFFF	SGRQVWVYTG	ASV·LG···P	RRL·DKLGLG	607
MMP-2	P-EKIDAVZE	APQEEKAVFF	AGNEYWYISA	STLERG··YP	KPL·TSLGLP	533
MMP-7	·····	·····	·····	·····	·····	267
MT-MMP	PTDKIDAALF	WMPNGKTYFF	RGNKYYRFNE	ELRAVDSEYP	KNIKVWEGIP	460
Consensus	P···DAAZE	·····FF	·GN·YW···G	·····G··YP	·I···LG·P	650
MMP-11	R··FPVHAAL	VWGPEKNKIY	FFGRDYWRF	HPSTRRVDSP	VPRRATDWRG	431
MMP-1	RTVKHIDAAL	S·EENTGKTY	FFVANKYWRY	DEYKRSMDPG	YPKMIAHDFP	420
MMP-8	SSVQAIDAAV	F··YRSKTY	FFVNDQFWRY	DNQRQFMPEG	YPKSISGAFP	418
MMP-10	PTIRKIDAAY	S·DKEKKKTY	FFAADKYWRF	DENSQSMEOG	FPRLIADDFP	430
MMP-3	PTVRKIDAAI	S·DKEKNKTY	FFVEDKYWRF	DEKRNSMEPG	FPKQIAEDFP	431
MMP-9	ADVAQVTGAL	R·SGRGKM·L	LFSGRRLLWRF	DVKAQMVDPR	SASEVDRMFP	655
MMP-2	PDVQVRVDAAF	N·WSKNKKTY	IFAGDKFWRY	NEVKKKMDPG	FPKLIADAWN	582
MMP-7	·····	·····	·····	·····	·····	267
MT-MMP	ESPRGSFM·G	SDEVFTYFYK	GKNKYWKFNQ	KLKVEPGYPK	SALRDWMGCP	509
Consensus	·V···DAA·	·····KTY	FF···K·WR·	D·····M·PG	·P··I···FP	700

Fig. 2H

MMP·11	VPSE·IDAA	FQADAGYAYF	LRGRLYWKFD	PVKVKALEGF	PRLV·····	473
MMP·1	GIGH·KVDA	V··FMKDGFF	·····YF·FH	GTRQYKFDPK	TKRILTLQ··	458
MMP·8	GIES·KVDA	V··FQZEHFF	·····HV·FS	GPRYYAFDLI	AQRVTRVA··	456
MMP·10	GVEP·KVDA	V··LQAFGFF	·····YF·FS	GSSQFEFDPN	ARMVTHIL··	468
MMP·3	GIDS·KIDA	V··FEEFGFF	·····YF·FT	GSSQLEFDPN	AKKVTHTL··	469
MMP·9	GVPL·DTHD	VFQYREKAYF	···CQDR·FY	WRVSSRSELN	QVDQVGYY··	697
MMP·2	AIPD·NLDA	VVDLQGGG··	·····HS·YF	FKGAYYLLKE	N·QSLKS VKF	621
MMP·7	·····	·····	·····	·····	·····	267
MT·MMP	SGGRPDEGTE	EETEVIIEV	DEEGGAVSA	AAVVLPLVLL	LLVLAVGLAV	559
Consensus	G·····DA	V·····F	·····F·	·····	·····	750
MMP·11	···GPD·FFG	CAE·····PA	NTFLX·····	·····	·····	489
MMP·1	···KANSWFN	CR·····KN	·····	·····	·····	469
MMP·8	···RGNKWLN	CRY·····GX	·····	·····	·····	468
MMP·10	···KSNSWLH	C·····	·····	·····	·····	476
MMP·3	···KSNSWLN	C·····	·····	·····	·····	477
MMP·9	···TYD·ILQ	CPE·····DX	·····	·····	·····	708
MMP·2	GSIKSD·WLG	C·····	·····	·····	·····	631
MMP·7	·····	·····	·····	·····	·····	267
MT·MMP	FFFRRHGTPR	RLLYCQRSL	DKV·····	·····	·····	582
Consensus	·····WL·	C·····	·····	·····	·····	796

Fig. 3

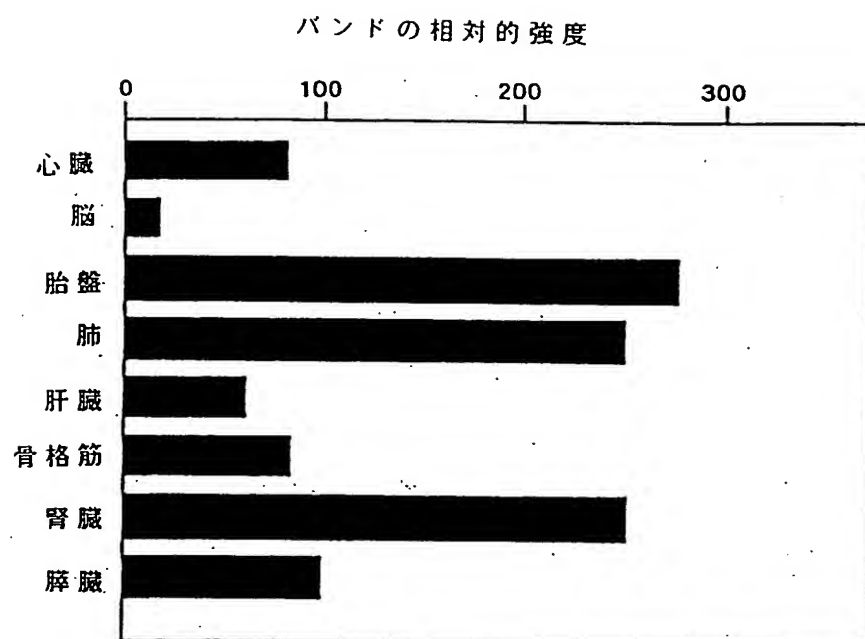


Fig. 4

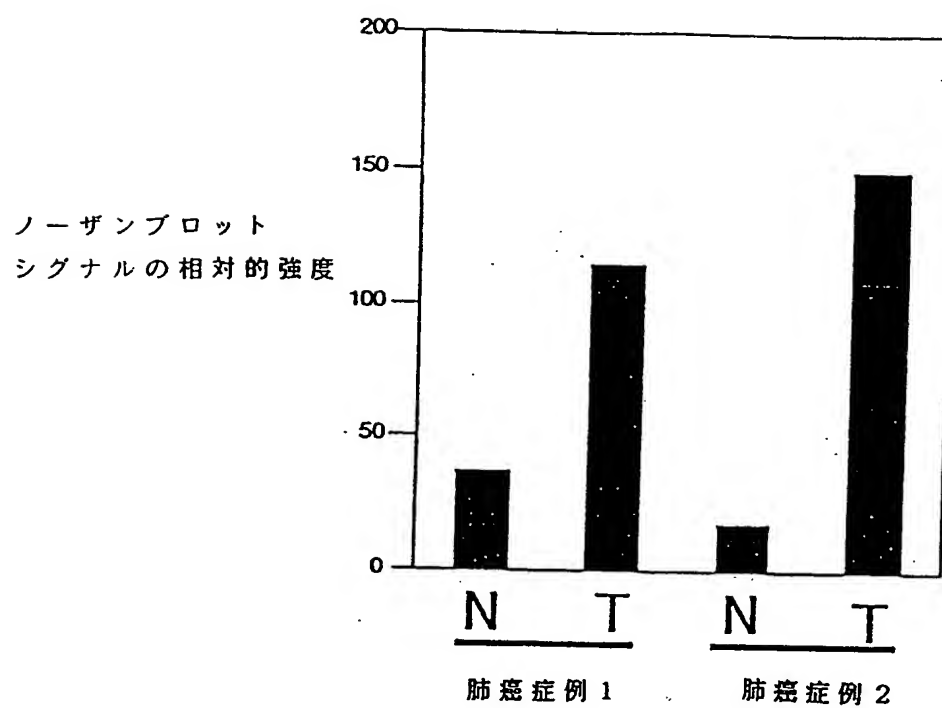


Fig. 5

MT-MMP cDNAによる
トランスフェクション
の有無

抗体

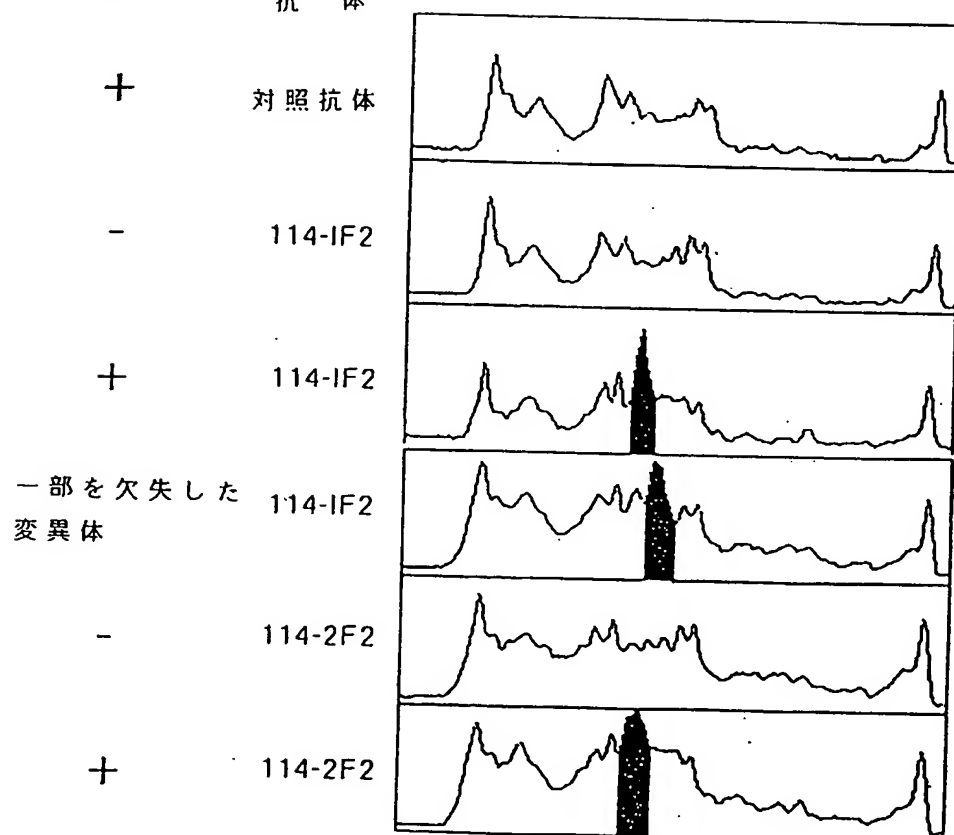


Fig. 6

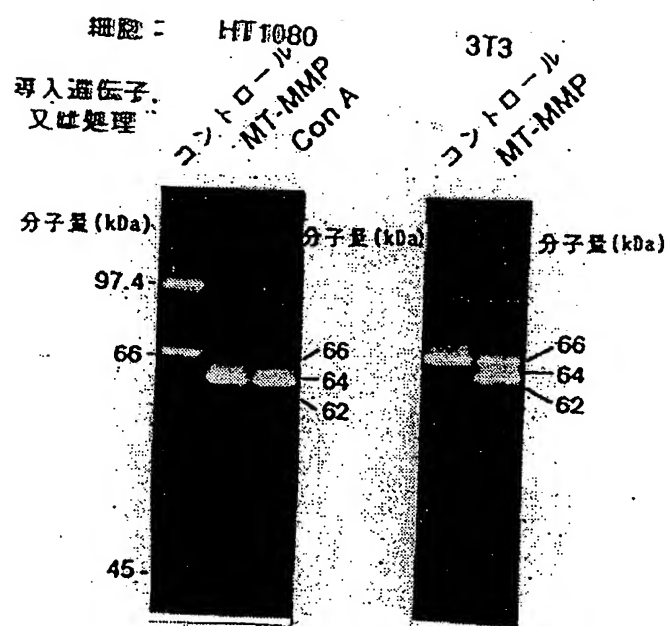


Fig. 7

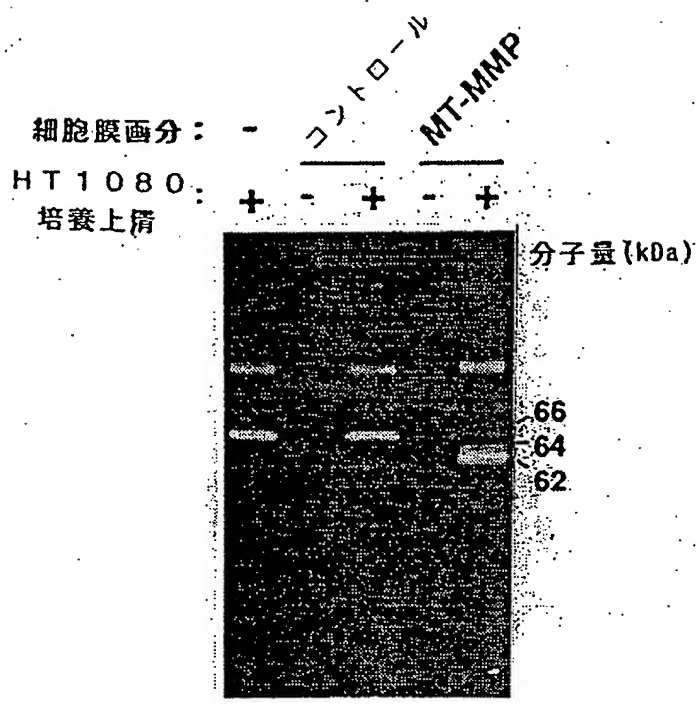
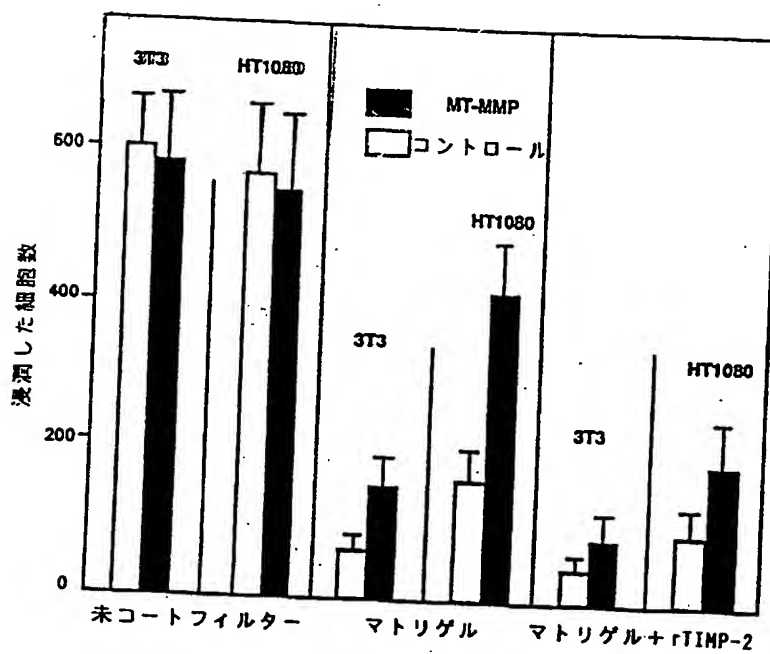


Fig. 8



BUDAPEST TREATY ON THE
INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称) 富士薬品工業株式会社
代表取締役社長 竹田 雄一郎

寄託者 殿
あて名 ⑨ 933
富山県高岡市長慶寺 53 番地

I. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)
マスキ由来単クローン性抗ヒト膜結合型マトリックスメタロプロテアーゼ
(MT-MMP) 抗体産生ハイブリドーマ (114-2F2)

(受託番号)
FERM BP- 4743

II. 科学的性質及び分類学上の位置

I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- ☒ 科学的性質
☒ 分類学上の位置

III. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 6 年 7 月 14 日 (原寄託日) に受領した I 欄の微生物を受託する。

IV. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に I 欄の微生物を受領した。
そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

V. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称: National Institute of Science and Human-Technology
Agency for Science and Technology

所長 鈴木 修 Osamu Suzuki, DIRECTOR GENERAL.

あて名: 日本国茨城県 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305)
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305, JAPAN

平成 6 年 (1994) 7 月 14 日

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/02009

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁶ C12N9/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁵ C12N9/50-9/64

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWES, WPI, CAS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Nature, Vol. 370, No. 6484, July 7, 1994 (07. 07. 94), Hiroshi Sato et al. "A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells" P. 61-65	1-5
A	Journal of Cancer Research Clinical Oncology, Vol. 117, No. 2, (1991), M. Siadat Pajour et al. "Expression of metalloproteinase genes in human prostate cancer" P. 144-150	1-5



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

January 20, 1995 (20. 01. 95)

Date of mailing of the international search report

February 7, 1995 (07. 02. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. ⁴ C12N9/64		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. ⁵ C12N9/50-9/64		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
BIOSIS PREVIEWS, WPI, CAS		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Nature, 第370巻, 第6484号, 7. 7月. 1994 (07. 07. 94), Hiroshi Sato et al. 「A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells」 p. 61-65	1-5
A	Journal of Cancer Research Clinical Oncology, 第117巻, 第2号, (1991), M. Siadat Pajour et al. 「Expression of metallo- proteinase genes in human prostate cancer」 p. 144-150	1-5
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
20. 01. 95	07.02.95	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 佐伯裕子 ㊞	4 B 9 1 5 2
	電話番号 03-3581-1101 内線	3449



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

